



A method has been developed by which cryopreserved blood can be put to use in the test. In this way, blood donations from a donor can be pre-tested so that uniform material may be employed in the test.

This test opens up entirely new perspectives on pyrogen testing for Gram-positive or fungal pyrogens as well as in medicinal products. In addition, it could fill the dangerous security gap which might result from the limitations of testing medications and blood products with LAL only.

The project was supported by ZEBET, D-Berlin, BMBF, D-Bonn, and set, D-Mainz.

Keywords: endotoxins, Gram-positive pyrogens, fungal pyrogens, human whole blood, interleukin-1

Korrespondenzadresse

Dr. Dr. Thomas Hartung
Universität Konstanz
Biochemische Pharmakologie
Postfach 5560
D-78434 Konstanz



Erste Erfahrungen bei der Prävalidierung des Vollblutpyrogentests für biologische Arzneimittel

Matthias Fischer¹, Katja Hartzsch¹, Thomas Hartung² und Thomas Montag-Lessing¹

¹Paul-Ehrlich-Institut; D-Langen, ²Biochemische Pharmakologie der Universität Konstanz, D-Konstanz

Zusammenfassung

Bei der Etablierung des alternativen Pyrogentestes für biologische Arzneimittel richteten sich erste Untersuchungen auf den Einsatz und die Behandlung des Standardpyrogens. Da es sich beim standardmäßig als Pyrogen eingesetzten LPS (Lipopolysaccharid) um eine stark hydrophobe Substanz handelt, spielt die Lösungsvermittlung eine besondere Rolle. Im Gegensatz zum LAL (Limulus-Amöbozyten-Lysat-Test) konnte aber für den Vollblutpyrogentest eine eher verminderte Reaktivität bei zunehmend homogener Verteilung gezeigt werden.

Für eine Reihe biologischer Arzneimittel konnten erste Erfahrungen beim Test auf Pyrogene im humanen Vollblutassay gesammelt werden. Dazu gehören Albumin, Immunglobuline, Impfstoffe, Blutgerinnungsfaktoren und virusinaktiviertes Plasma. Mit Ausnahme der Impfstoffe und Albumine sind diese Arzneimittel z.Z. nur im Kaninchenpyrogentest testbar.

Für Albumin konnte gezeigt werden, daß durch das Arzneimittel eine leichte Verstärkung der Pyrogenität des Standard-LPS auftritt. Mit den Albuminen konnten sonst sicher reproduzierbare Ergebnisse erzielt werden. Die Nachweisgrenze lag deutlich unter 50 pg/ml LPS.

Die Immunglobulinpräparate zeigen einen ähnlichen Verstärkungseffekt wie Albumine.

Mit Standardpyrogen dotierte Proben konnten sicher als pyrogen erkannt werden.

Die getesteten Impfstoffe zeigten leichte Pyrogenität, die aber erst bei Verdünnung der Impfstoffe sichtbar wurde. Unverdünnt eingesetzt maskierten die Impfstoffe auch Standardpyrogendotierungen.

Summary: First Results in the prevaluation of the human whole blood assay for pyrogens in biological pharmaceuticals. When establishing the whole blood assay for pyrogens in our laboratory we did several investigations on the standard pyrogen to be used. Because of the hydrophobicity of the lipopolysaccharid (LPS) it is difficult to get a homogeneous solution. Therefore we used ultrasonic and biphenyl hydroxyl amine chloride for a better dispergation.

Surprisingly the reactivity of the LPS in the whole blood assay for pyrogens dropped the more the LPS was dispergated. That's right inverse to the situation in the LAL.

There are first experiences in the whole blood assay for pyrogens with biological pharmaceuticals. This includes immunoglobulins, vaccines and coagulation factors.

Except of the vaccines and albumin the rabbit assay is the only way to test these pharmaceuticals for pyrogens.

The albumins show a little amplification of the reactivity of LPS in the whole blood assay for pyrogens. The testing of albumin in the whole blood assay for pyrogens showed highly reproducible results and a detection limit under 50 pg/ml LPS.

The immunoglobulins show an amplifying effect as well. Immunoglobulins spiked with LPS were detected as pyrogenic in all cases.

Some vaccines show a slight pyrogenity in the whole blood assay which gets visible when diluting the sample. Undiluted vaccines may cover a LPS contamination in the whole blood assay for pyrogens.

Keywords: pyrogen testing, whole blood model, endotoxin, interleukin, contamination of biological products

1 Einleitung

Parenteralia, also Arzneimittel, die durch Injektion oder Infusion verabreicht werden, müssen auf ihren Gehalt an fiebererzeugenden Stoffen getestet werden. Die Prüfung auf Pyrogene ist in allen Pharmakopöen der Welt beschrieben. Diese Prüfung erfolgt durch die intravenöse Injektion der zu prüfenden Substanz in die Ohrvene eines Kaninchens. Nach der Infusion der Substanz wird der Anstieg der Körpertemperatur einer Gruppe von Kaninchen in einer bestimmten Beobachtungszeit gemessen. Nach Ph. Eur. (1997) wird die Prüfung zunächst mit einer Gruppe von drei Kaninchen durchgeführt.

Die Temperatur wird über drei Stunden nach der Injektion und 90 Minuten vor der Injektion aufgezeichnet. Ist die Summe der Temperaturdifferenzen gegenüber der Ausgangstemperatur der drei Kaninchen einer Gruppe kleiner als 1,15° C gilt der Pyrogentest als bestanden. Ist die Summe der Temperaturdifferenzen größer als 1,15° C, aber kleiner als 2,65° C, muß der Test mit weiteren drei Kaninchen wiederholt werden. Die erste Wiederholung gilt als bestanden, wenn die Summe der Temperaturdifferenzen über alle sechs Kaninchen unter 2,8° C liegt, eine Wiederholung ist bis 4,3° C erlaubt. Der Pyrogentest gilt als endgültig nicht bestanden wenn in der dritten Wiederholung die Summe der Temperaturdifferenzen von zwölf Kaninchen 6,6° C überschreitet.

Als *in vitro* Methode steht die Prüfung auf Bakterienendotoxine zur Verfügung und hat in Form des Limulus-Amöbozyten-Lysat-Testes (LAL) Eingang in viele Arzneibücher gefunden. Obwohl der LAL inzwischen in pharmazeutischer Industrie und Überwachungsbehörden zur Routine gehört, konnte er den Kaninchenpyrogentest nicht vollständig ersetzen. Die Hauptgründe dafür sind, daß eine Reihe von Arzneimitteln im LAL nicht getestet werden können (unter anderem die meisten biologischen Arzneimittel), und daß der LAL von den verschiedenen fiebererzeugenden Stoffen nur die Endotoxine (Zellwandbestandteile gramnegativer Bakterien in Form von Lipopolysacchariden) erkennt. Diese Schwierigkeiten machen beim Ersatz des Kaninchenpyrogentests durch den LAL eine produktbezogene Validierung des LAL nötig. Das heißt, die

Validierung muß von jedem Hersteller für sein Produkt einzeln durchgeführt werden. Zur Validierung gehören (Bundesanzeiger, 1993) der Nachweis der Sensitivität des verwendeten LA-Lysates, Nachweis, daß das Präparat keine Störfaktoren für den LAL enthält und daß das Produkt keine nicht-Endotoxinpyrogene enthält (dieser Nachweis muß in Paralleltestung zum Kaninchenpyrogentest erfolgen).

Der hier angewendete humane Vollblutpyrogentest ermöglicht es dagegen, alle Pyrogene, die über eine periphere Ausschüttung sogenannter endogener Pyrogene (Interleukin-1-Beta) Fieber induzieren, zu erkennen.

Mit dem humanen Vollblutpyrogentest steht somit ein *in vitro* Testsystem zur Verfügung, welches neben dem LPS auch andere Pyrogene erfaßt und auch für biologische Arzneimittel einsetzbar ist.

2 Material und Methoden

Der humane Vollblutassay wurde durchgeführt, wie von Hartung und Wendel (1995) beschrieben. Es wurde Heparinblut verwendet, welches in einem Volumenverhältnis 1:11 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde (100 µl heparinisiertes Blut in 1 ml physiologische Kochsalzlösung). Dazu wurden 100 µl der zu prüfenden Substanz gegeben und eine Inkubation über 20 Stunden bei 37° C durchgeführt. Nach der Inkubation wurden die Inkubationsgefäße einmal gemischt, bei 3000 g die zellulären Bestandteile abzentrifugiert und in einem Aliquot von 100 µl die Interleukin-1-β-Konzentration mittels ELISA bestimmt.

Als Endotoxinstandard wurde LPS von *Salmonella abortus equi* von Sigma (Deisenhofen) bzw. der Standard NP3 von Pyroquant Diagnostik (Walldorf) verwendet. Zur Einstellung der Standardpyrogene wurde der LAL Gelierungstest von Pyroquant Diagnostik (Walldorf) verwendet.

Es wurden folgende Arzneimittel zur Prüfung auf Pyrogene im alternativen Pyrogentest eingesetzt: humanes Serumalbumin (fünfprozentig), Immunglobulinpräparate (50 mg Protein pro ml); Blutgerinnungsfaktor VIII, Tollwutimpfstoff (inaktiviert), Gelbfieberlebendimpfstoff.

Alle Präparate wurden im alternativen Pyrogentest pur und in Verdünnungen von 1:10 bis 1:10000 eingesetzt. Außerdem wurde eine Dotierung (spiking) jedes Ver-

dünnungsniveaus durchgeführt. Dazu wurde jedes Verdünnungsniveau so mit LPS von *S. abortus equi* versetzt, daß sich eine Konzentration von 250 pg/ml LPS ergab.

3 Ergebnisse und Diskussion

Der humane Vollblutpyrogentest ist ein Test, der neben dem Vorteil als *in vitro* Verfahren einen Tierversuch ablösen zu können, auch noch den Vorzug mit sich bringt, die Frage der Pyrogenität im homologen System testbar zu machen. Das heißt, da es beim Pyrogentest um die Frage einer eventuellen Pyrogenität beim Menschen geht, verringert ein Arbeiten mit menschlichem Blut die Zahl der Testvariablen.

Der humane Vollblutpyrogentest wird zur Zeit im Rahmen eines vom BMBF geförderten Forschungsprojektes prävalidiert und evaluiert. Da an diesem Projekt mehrere Partner beteiligt sind, spielen bei der Anwendung des Testsystems im Moment noch Varianzen eine Rolle, die erst nach konsequenter Zusammenführung aller Evaluierungsdaten exakt ausgewiesen werden können. Um vor diesem Hintergrund dauerhaft verwertbare Daten erzielen zu können, haben wir bestimmte Varianzen zunächst laborintern minimiert. Dazu gehören:

1) Spendervarianz des eingesetzten Blutes. Diese wurde bei unseren Untersuchungen zunächst konstant gehalten, indem wir nur Blut von zwei Spendern verwendeten.
2) Die verwendeten Standardpyrogene, die LPS verschiedener Bakterienspezies zeigen sich unterschiedlich reaktiv. Alle hier vorgestellten Ergebnisse wurden mit einem LPS von *Salmonella abortus equi* erzielt.

3) Die Behandlung des Standardpyrogens spielt eine besondere Rolle. Da es sich bei LPS um eine stark hydrophobe Substanz handelt, ist eine homogene Verteilung der Moleküle im wässrigen Milieu schwer zu erreichen und die LPS-Moleküle neigen zur Bildung von Mizellen. Standardpyrogenlösungen wurden ultrabeschallt und mit dem Lösungsvermittler Hydroxylaminhydrochlorid versetzt, da mit der Homogenität der Verteilung des LPS auch die Reaktivität der Lösung im LAL steigt.

Wir konnten im Vollblutpyrogentest ein gerade umgekehrtes Verhalten beobachten. LPS von *Salmonella abortus equi* in

Konzentrationen von 50-1000 pg/ml zeigte ohne Ultraschallbehandlung und ohne Zusatz von Hydroxylaminhydrochlorid eine um ein Drittel höhere Ausschüttung von Interleukin-1- β im humanen Vollblutassay als entsprechend behandeltes LPS. Als Ergebnis dieser Beobachtung setzen wir nur mit Ultraschall behandeltes und mit Hydroxylaminhydrochlorid versetztes Standardpyrogen bzw. kommerzielle Pyrogenstandards ein.

3.1 Humanes Serumalbumin (HSA) im Vollblutpyrogentest

HSA wird in den Konzentrationen von 5%-25% als Infusion eingesetzt.

Die Prüfung auf Pyrogene erfolgt nach Ph. Eur. im Kaninchenpyrogentest. Eine Prüfung im LAL ist zwar prinzipiell möglich, erweist sich aber als störanfällig. Die Grenzwerte für einen maximal zulässigen Endotoxingehalt liegen bei 133 pg/ml für 20%iges HSA (max. Injektionsvolumen 3,75 ml/kg Körpergewicht/ Std.) und 50pg/ml für 5%iges HSA (max. Injektionsvolumen 10,00 ml/kg Körpergewicht/ Std.) (FDA Interims Guidance, 1991).

Im humanen Vollblutpyrogentest konnten Endotoxindotierungen ab 50 pg/ml in HSA sicher erkannt werden.

Bei vergleichenden Prüfungen von LPS-Verdünnungsreihen in HSA und physiologischer Kochsalzlösung zeigte sich ein verstärkender Effekt des Albumins auf die Interleukin-1- β -Ausschüttung im humanen Vollblutassay.

3.2 Immunglobuline

Immunglobuline kommen als Infusionsarzneimittel mit einer maximalen Applikationsdosis von 5,5 ml pro kg Körpergewicht und Std. zum Einsatz. Der maximal tolerierbare Endotoxingehalt liegt damit bei 91 pg/ml (FDA Interims Guidance, 1991). Die Prüfung auf Pyrogene erfolgt nach Ph. Eur. im Kaninchenpyrogentest. Im Vollblutpyrogentest konnten Endotoxindotierungen in Immunglobulinpräparaten ab 50 pg/ml sicher erkannt und eine Verstärkung der Interleukinausschüttung in gleicher Weise wie bei den Albuminen beobachtet werden. Werden die Immunglobulinpräparate mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und jede Verdünnungsstufe mit gleichbleibenden Endotoxinkonzentrationen versetzt, so kommt es bei 1000 pg/ml LPS in unverdünntem Immunglobulin zu einer dreimal

so hohen Interleukin-1- β - Ausschüttung im humanen Vollblutassay, wie bei 1000pg/ml LPS in 1:10 verdünntem Immunglobulin.

Der Vergleich von natürlich kontaminierten Präparaten, die den Kaninchenpyrogentest nicht passieren konnten, zeigt verschiedene Reaktionsmuster:

1) Ein Präparat passierte den Kaninchenpyrogentest sehr knapp in der dritten Wiederholung (Summe der Temperaturdifferenzen über 12 Kaninchen: 6,35° C). Die Prüfung des Immunglobulinpräparates in verschiedenen Salineverdünnungen im humanen Vollblutpyrogentest ergab:

ohne Verdünnung : - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS Verdreifachung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10: - eine verstärkte Interleukinausschüttung (sechsfach höher als die Negativwerte) und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS leichte Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:100: - eine verstärkte Interleukinausschüttung (dreifach höher als die Negativwerte) und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10000: - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

2) Ein Präparat passierte den Kaninchenpyrogentest in der ersten Wiederholung (Summe der Temperaturdifferenzen über 6 Kaninchen: 2,75° C). Die Prüfung des Immunglobulinpräparates in verschiedenen Salineverdünnungen im humanen Vollblutpyrogentest ergab:

ohne Verdünnung : - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10: - eine verstärkte Interleukinausschüttung (zweifach höher als die Negativwerte) und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:100: - eine verstärkte Interleukinausschüttung (dreifach höher als die Negativwerte) und bei Dotierung

mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10000: - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

3) Ein Präparat verfehlte den Kaninchenpyrogentest im ersten Ansatz (Summe der Temperaturdifferenzen über 3 Kaninchen: 3,2° C). Die Prüfung des Immunglobulinpräparates in verschiedenen Salineverdünnungen im humanen Vollblutpyrogentest ergab:

ohne Verdünnung : - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10: - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:100: - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

in Verdünnung 1:10000: - keine verstärkte Interleukinausschüttung und bei Dotierung mit 250 pg/ml LPS keine Erhöhung der Interleukinausschüttung gegenüber 250 pg/ml LPS in Saline.

Es darf die interessante Schlußfolgerung gezogen werden, daß natürliche Pyrogenkontaminationen in Immunglobulinpräparaten im Vollblutpyrogentest maskiert werden können, sie werden aber teilweise nach Verdünnung sichtbar. Die Korrelation zum Kaninchenpyrogentest ist in Bezug auf LPS gegeben. Bei natürlichen Pyrogenkonzentrationen unbekannter Natur kommt es vereinzelt zu widersprüchlichen Befunden, die einer weiteren Klärung bedürfen.

3.3 Impfstoffe

Es wurden zunächst zwei Virusimpfstoffe (ein inaktivierter Tollwutimpfstoff und ein Lebendimpfstoff gegen Gelbfieber) im humanen Vollblutpyrogentest untersucht.

Da Impfstoffe nicht intravenös verabreicht werden, ist hier der Endotoxingrenzwert deutlich höher. Er beträgt für Tollwutimpfstoffe 2500 pg pro Impfdosis und für Gelbfieberimpfstoff 500 pg pro Impf-

dosis. Die Prüfung auf Pyrogene bzw. bakterielle Endotoxine erfolgt nach Ph. Eur. im LAL.

Bei den Testungen im humanen Vollblutassay zeigte der inaktivierte Tollwutimpfstoff keine Induktion von Interleukin-1- β -Ausschüttung und maskierte die durch Standardpyrogen induzierte Interleukinausschüttung bis zu einer Verdünnung von 1:10.

Der Gelbfieberimpfstoff induzierte selbst eine Zytokinausschüttung, die bei einer Verdünnung von 1:100 messbar war, eine Maskierung des Standardpyrogens war nicht sichtbar.

3.4 Blutgerinnungsfaktoren

Blutgerinnungsfaktoren werden intravenös appliziert. Die Prüfung auf Pyrogene erfolgt nach Ph. Eur. im Kaninchenpyrogentest.

Im humanen Vollblutassay zeigten einzelne Präparate (Kaninchenpyrogentest negativ) eine Interleukininduktion, die sich ab einer Verdünnung von 1:10 verlor. Eine im Kaninchenpyrogentest aufgetretene Pyrogenität (Temperaturdifferenz über 3 Tiere = 3,65° C) wurde im humanen Vollblutassay sicher erkannt (Interleukinausschüttung fünfzigfach höher als die Negativwerte), wenn das Präparat unverdünnt eingesetzt wurde.

4 Schlußfolgerungen

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der humane Vollblutpyrogentest für biologi-

sche Arzneimittel prinzipiell geeignet ist. Es ist aber für jedes biologische Arzneimittel aufgrund seiner komplexen Zusammensetzung eine Validierung notwendig. Mit dem Vollblutpyrogentest können Verunreinigungen mit LPS sicher und mit ausreichender Sensitivität erkannt werden. Aber nicht nur LPS als Oberflächenbestandteil gramnegativer Bakterien, sondern auch andere Substanzen können als exogene Pyrogene wirksam werden. Da die Pyrogene mit Ursprung in Viren, Pilzen, Parasiten und grampositiven Bakterien in ihrer Natur unbekannt sind, kann auch wenig über ihr fiebererzeugendes Potential in verschiedenen Spezies gesagt werden. Die Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen des humanen Vollbluttests und dem Kaninchenpyrogentest bedürfen einer sorgfältigen Prüfung ihrer Ursachen (s. auch Hartung et al. in diesem Heft weiter unten). Der Kaninchenpyrogentest ist zwar ein Test für den umfangreiche Erfahrungen aus der Praxis vorliegen, aber wie bei jedem Tierversuch bleibt bei der Übertragung der Ergebnisse vom Tier auf den Menschen ein Interpretationsspielraum. Der Vollblutpyrogentest hat demgegenüber den Vorteil, im homologen System zu arbeiten. Bei den hier beobachteten Interleukinausschüttungen ist es durchaus möglich, daß dies auch mit einer Fieberreaktion beim Menschen korreliert, wenn der Kaninchenpyrogentest negativ ausgefallen war. Umgekehrt ist es auch denkbar, daß trotz einer Fieberreaktion im Kaninchen der Mensch nicht mit Fieber rea-

giert. Die fehlende Interleukin-1- β im Vollblutpyrogentest ist ein Hinweis in diese Richtung.

Der Vollblutpyrogentest ist also nicht nur potentiell in der Lage, den Kaninchenpyrogentest abzulösen, sondern kann mit hoher Wahrscheinlichkeit auch helfen, bisher unklare Fieberreaktionen aufzuklären.

Literatur

- Bundesanzeiger (1993). *Bundesanzeiger 2 vom 6.1.1993*, S. 63.
- Ph. Eur. (1997). *Europäisches Arzneibuch*, 3. Ausgabe (1997). Stuttgart: Deutscher Apotheker Verlag, Eschborn: Govi-Verlag- Pharmazeutischer Verlag GmbH.
- Hartung T. und Wendel A. (1995). Die Erfassung von Pyrogenen in einem humanen Vollblutmodell. *ALTEX 12*, 70-75.
- FDA Interims Guidance (1991). U.S. Food and Drug Administration. Guideline on validation of the Limulus Amebocyte test as an in-product endotoxin test for human and animal parenteral drugs, biological products, and medical devices. DHHS, Dec. 1987, and Interims Guidance, 1991.

Korrespondenzadresse

Matthias Fischer
Paul-Ehrlich-Institut
Abteilung Bakteriologie
Paul-Ehrlich-Str. 51-59
D-63225 Langen
E-mail: M.Fischer@em.uni-frankfurt.de



Prävalidierung von Parenteralia im humanen Vollblutmodell

Markus Weigandt, Peter Lexa und Hans-Günther Sonntag
Hygiene-Institut der Universität Heidelberg, D-Heidelberg

Zusammenfassung

Im humanen Vollblut-Pyrogentest wird zum Nachweis von Pyrogenen die dem natürlichen Fiebermechanismus entsprechende pyrogeninduzierte Ausschüttung von IL-1 β als Prüfkriterium herangezogen.

Um den Kaninchen-Pyrogentest als bisherige offizielle Standardmethode zu ersetzen, sind Untersuchungen zur Validierung des Vollblut-Pyrogentests nötig. Dabei konnten unter Einbeziehung einer größeren Spenderpopulation die

folgenden Ergebnisse dargestellt werden:

- 1) *In Blutproben ohne LPS (Pyrogen)-Stimulation ließ sich kein IL-1 β nachweisen.*
- 2) *Stimulation mit LPS ergibt eine konzentrationsabhängige Ausschüttung von IL-1 β , wobei unabhängig von den individuellen Blutproben eine Mindestkonzentration von 2-5 pg/ml LPS von *S. abortus equi* erforderlich ist.*
- 3) *Die absolute Menge des ausgeschütteten IL-1 β variiert interindividuell deutlich.*